運用分子標幟輔助選拔提昇水稻「台稉九號」品種之耐旱性

林昆鴻[1]、郭介煒[1]、許育嘉[2]、林彥蓉[3]、吳永培[2,*]

[1]國立嘉義大學農藝系

[2]行政院農委會農業試驗所嘉義分所

[3]國立臺灣大學農藝系

摘要

本研究以秈型稻耐旱品種'HY15'為貢獻親，而臺灣優良稉型稻'TK9'為輪迴親，透過回交方式將'HY15'之耐旱性轉移至'TK9'。過程中利用 28%聚乙二醇 6000 (*polyethylene glycol 6000; PEG-6000*)溶液的模擬缺水逆境處理，挑選出耐旱的植株，並於各回交世代之 $BCxF_1$ 與 BC_4F_2 進行分子標幟輔助背景選拔。結果發現，BC_2F_1、BC_3F_1、BC_4F_1 及 BC_4F_2 世代回復輪迴親遺傳背景之比率分別為 86.2、91.6、94.5 及 93.0%。而以'HY15'、'TK9'及 10 個 BC_4F_4 品系於三葉齡、五葉齡及七葉齡等 3 個幼苗時期，分別以 28% PEG-6000 模擬缺水之水分逆境處理評估材料之耐旱性表現，試驗發現多數品系之耐旱性表現優於輪迴親'TK9'，顯示已將'HY15'之耐旱特性導入'TK9'中，培育出高耐旱之稉型稻新品系。進一步評估 12 個耐旱品系(BC_4F_4)在水分管理下產量與構成要素表現，結果發現 DT22 擁有較重的穗重，DT38 和 DT56 則具較高稔實率，三個品系稻穀產量皆達 5,000 kg ha^{-1} 以上，顯示獲選之三個耐旱品系具有缺水環境下之實際耐旱性栽培價值，未來可命名成為適合臺灣栽培利用之耐旱水稻新品種潛力。

關鍵詞：分子標幟輔助選拔、耐旱、水稻。

* 通信作者, wuypei@dns.caes.gov.tw

投稿日期：2014 年 8 月 25 日
接受日期：2014 年 10 月 16 日
作物、環境與生物資訊 11:177-194 (2014)
Crop, Environment & Bioinformatics 11:177-194 (2014)
189 Chung-Cheng Rd., Wufeng, Taichung 41362, Taiwan ROC

Increasing Drought Tolerance of Rice Cultivar 'TK9' Using Marker-Assisted Selection

Keung-HungLin[1], Chieh-Wei Kuo[1], Yu-Chia Hsu[2], Yann-Rong Lin[3] and Yong-Pei Wu[2,*]

[1] Department of Agronomy, National Chiayi University, Chiayi 60004, Taiwan ROC

[2] Department of Agronomy, Chiayi Agricultural Experiment Station, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi 60014, Taiwan ROC

[3] Department of Agronomy, National Taiwan University, Taipei 10617, Taiwan ROC

ABSTRACT

To introgress the gene(s) conferring drought-tolerance to the Taiwanese elite *japonica* cultivar 'Taikeng 9 (TK9)', a drought-tolerant cultivar 'Hang-yu 15 (HY15)' was used as a donor parent crossed to 'TK9'. Four backcrossing practices were conducted and the progenies of each backcross generation BC_xF_1 were screened for drought tolerance by treating with 28% PEG-6000 solution and consequently selected by molecular markers to recover the recurrent parent's genome. The percentages of recurrent parent recovery within selected individuals were 86.2, 91.6, 94.5 and 93.0% in BC_2F_1, BC_3F_1, BC_4F_1 and BC_4F_2, respectively. The 'HY15', 'TK9' and ten BC_4F_4 drought-tolerant lines were further evaluated for drought tolerance under the treatment of 28% PEG-6000 at three-leaf, five-leaf, and seven-leaf stages. More than half BC_4F_4 lines exhibited higher tolerance to drought stress than the recurrent parent, implying that the drought-tolerant characteristic of 'HY15' was successfully transferred to 'TK9' using marker assisted selection (MAS). In addition, 12 drought-tolerant BC_4F_4 lines were evaluated for

grain yields and yield components. Among them, DT22 had heavy panicle weight and DT38 and DT56 had highest fertility. Three of drought-tolerance lines produced more than 5,000 kg ha^{-1}, indicating that these three drought-tolerant lines can be grown in fields under water saving cultivation system. These drought-tolerant lines have potential to be developed as new rice cultivars for water-saving rice production in Taiwan.

Key words: Marker-assisted Selection (MAS), Drought tolerance, Rice.

前言

水稻是全球最重要的栽培作物之一，全世界超過 50%人口以稻米為主要食物來源。隨著世界人口持續的快速增加，預計全球人口將從現有的 70 億增加到 2050 年的 92 億。糧食短缺將成為全球面臨的重大挑戰問題之一，預計 2025 年糧食要增產 50%才能滿足日益增長的需要(Bruinsma 2009)。影響水稻產量的因素將造成全球糧食安全危機和加劇地區的貧困，由於全球氣候變化和水資源的短缺，乾旱會成為穩定糧食生產的重要限制性因素。全世界有 34%之水稻生產田區(約五千四百萬公頃)是依靠雨水灌溉，每年田區大都會遭受到不同程度的乾旱影響(Maclean *et al.* 2002)。而由於水源的穩定供應難以掌控，在有限的水資源條件下，舒緩和減輕乾旱對稻米生產所造成之影響，乃成為悠關未來稻米能否順利生產的重要關鍵，解決此一問題的途徑可透過培育高產且耐旱之水稻品種達成。

以往對水稻耐旱特性的遺傳行為了解甚少，尤其缺乏有效的篩選技術來挑選耐旱雜交後代，造成耐旱性之遺傳改良進展相當緩慢 (Khush 2001, Evenson and Gollin 2003)。因此部份學者建議以耐旱之相關性狀，諸如根系、穗長、捲葉程度、水分利用效率和氣孔阻力等形態與生理生化性狀作為耐旱性之指標(Fukai *et al.* 1999, Price and Courtois 1999, Jongdee *et al.* 2002, Pantuwan *et al.* 2002, Toorchi *et al.* 2003)。而在跨入後基因體時代，水稻育種家更嚐試將分子生物技術運用於傳統育種上，藉以縮短水稻育種的年限。此一企圖在水稻分子標幟發展日趨完備的情形，使得水稻分子標幟輔助育種(marker-assisted selection; MAS)的發展潛力與日俱增。國際水稻基因體計畫(International Rice Genome Sequencing Project; IRGSP) 完成稉稻「日本晴」(‘Nipponbare’)全基因體共約 389 Mb 的解序(IRGSP 2005)，促進了各種分子標幟的發展，隨後應用在水稻育種上，提高了育種效率和精確性(Collard and Mackill 2008)，此即為分子標幟輔助選拔。其可在不受環境干擾下準確挑選目標植株，並在全生育期進行選拔，應用於幼苗期篩選更可減少田間種植數量、人力和物力等耗費，尤其可用在多基因轉移與堆疊於同一優良水稻品系中。目前水稻育種上利用分子標幟輔助育種技術的成果相當多，如：國際稻米研究所利用‘Pokkali’和‘IR29’雜交之 F_8 重組自交系族群所進行的耐鹽研究中，發現一個高耐鹽品系 FL478 (IR66946-3R-178-1-1)，目前已利用分子標幟輔助回交育種的方式，將 FL478 之耐鹽 *saltol* 基因導入一些優良品種中(Thomson *et al.* 2010)；同樣也應用在耐淹特性的改良，將耐淹的 *Sub1* QTL 導入‘Swarna’、‘IR64’和‘Sumba Mahsuri’等水稻品種，除了保有各個品種原有之高產與優良農藝性狀外，更增加耐淹的特性(Neeraja *et al.* 2007)。Gregorio *et al.* (2013)更選用分別帶有 *saltol* 和 *Sub1*QTL 之品系雜交，並經分子標幟輔助培育出 IR84649-81-4-B-B 品系，在鹽逆境的試驗中，農藝性狀上無出現負面效應，且其淹水兩個禮拜以上尚有 91%植株存活，與對照 IR64-Sub 的 92%表現相同，兼具了耐鹽和耐淹特性；其他尚有抗稻熱病(Jiang *et al.* 2012)、抗褐飛蝨(Hu *et al.* 2013)、穀粒產量(Swamy and Kumar 2013)及大量應用 MAS 在改良作物育種上的實例(Collard *et al.*

2008)等，有效提高了水稻的稻米品質、抗病及抗逆境的特性。至於在耐旱水稻品種育成上，利用耐旱性稉型陸稻'Azucena'與秈型陸稻'Kalinga III'建立回交族群，利用分子標幟輔助技術將四個來自'Azucena'的目標片段進行轉移並選拔，其回交後代在缺水和慣行灌溉之田間環境下，植株根長上有顯著的提高效果(Steele *et al.* 2006)，育成之 4 個近同源系進一步在乾旱條件下測試，結果發現穀粒產量相對於輪迴親'Kalinga III'有明顯提高(Steele *et al.* 2007)，最後育出一個高產且耐旱的水稻品種'BirsaVikasDhan 111' (Steele *et al.* 2013)。Uga *et al.* (2013)將 *DRO1* 利用回交導入'IR64'，在乾旱條件下回交後代之近同源系可增加根系的深度，除增強避旱性外，亦保留高產的表現。*DRO1* 是第一個被選殖出來的作物根系 QTLs，已證實可控制根系統結構(root system architecture; RSA)，並有效地增強水稻的避旱性。

本試驗利用大陸育成之耐旱秈型稻'HY15'為材料，透過分子標幟輔助回交育種的方式，將耐旱特性轉移至稉型稻'TK9'中。本研究在每個世代主要是在水稻幼苗期透過 PEG 溶液模擬及分子標誌的背景選拔，篩選出與 TK9 背景相同且具耐旱性之水稻，並於 BC_4F_4 世代藉由田間耐旱試驗，篩選在成株期具耐旱性之品系，培育出全生育時期均有耐旱特性之新品系。此乃因幼苗期耐旱性之控制基因可能與成株期有別所訂定之篩選策略，此種篩選方式不僅有效率，更可保留全生育期或特定時期具耐旱潛力之植株。希望經由本研究所建立之分子標幟輔助耐旱水稻育種模式，未來可應用在更多優良水稻品種的耐旱改良，選育耐旱稉稻新品種，以因應氣候變遷下缺水逆境之水稻育種、栽培及糧食生產時所需種原。

材料與方法

一、試驗材料

回交選拔耐旱族群之建立

本試驗選用「台稉 9 號」('TK9')為母本與「旱育 15」('HY15')為父本進行雜交，並以'TK9'為輪迴親建立'TK9'與'HY15'各回交世代供分子標幟輔助選拔利用。其中「旱育 15 號」('Hang-yu 15')為雜交組合中提供耐旱特性之貢獻親本，其為來自大陸育成之秈型耐旱水稻品種，由具高產潛力親本'Qixiuzhuan'與具耐旱特性親本'Zhonghan 3'進行雜交選育(Luo 2010)。回交過程以'TK9'為輪迴親本與雜交 F_1、BC_xF_1 (父本)進行回交，建立分子標幟輔助選種所需 BC_1F_1、BC_2F_1、BC_3F_1、BC_4F_1 及 BC_4F_2 各世代之材料(Fig. 1)，各回交世代材料數目在 BC_1F_1 有 100 株、BC_2F_1 有 102 株、BC_3F_1 為 150 株、而 BC_4F_1 世代則有 105 株；各回交世代以水耕液培養至秧苗 3–4 葉齡後，經含 28% PEG-6000 之水耕液進行乾旱逆境處理，其存活植株供分子標幟輔助背景選拔利用。而獲選植株隨後則移至田間種植，於抽穗時期供為母本進行回交操作，其中 BC_1F_1 選獲有 19 株、BC_2F_1 有 9 株及 BC_3F_1 有 4 株，各世代選出之植株皆進行回交。而 BC_4F_1 世代則獲選 68 株之耐旱植株，經移植田間栽種於自交後得到 BC_4F_2 種子，BC_4F_2 世代進行產量試驗後，再依譜系法繼續純化繁殖成 BC_4F_3 及 BC_4F_4 品系，而 BC_4F_4 各品系進一步供缺水逆境下之評估試驗、產量構成要素及不同水稻發育期耐旱性調查利用。

耐旱品系產量試驗

品系產量比較試驗：'TK9'與'HY15'雜交組合回交後代經模擬缺水逆境處理後，存活植株即為具耐旱性之 BC_4F_1 子代，68 個 BC_4F_1 子代自交並單株收穫得到 BC_4F_2 種子，BC_4F_2 進一步種植成 68 個品系於田間，同時並加入對照親本 'HY15' 及 'TK9'，編成代號 DT1~DT68，於 2013 年一期作進行，每品系種植 32 株，每一品系 4 行植，每行 8 株，行株距為 0.30 m × 0.15 m，不設重複，於成熟時各品系分別收穫調查稻穀產量表現。

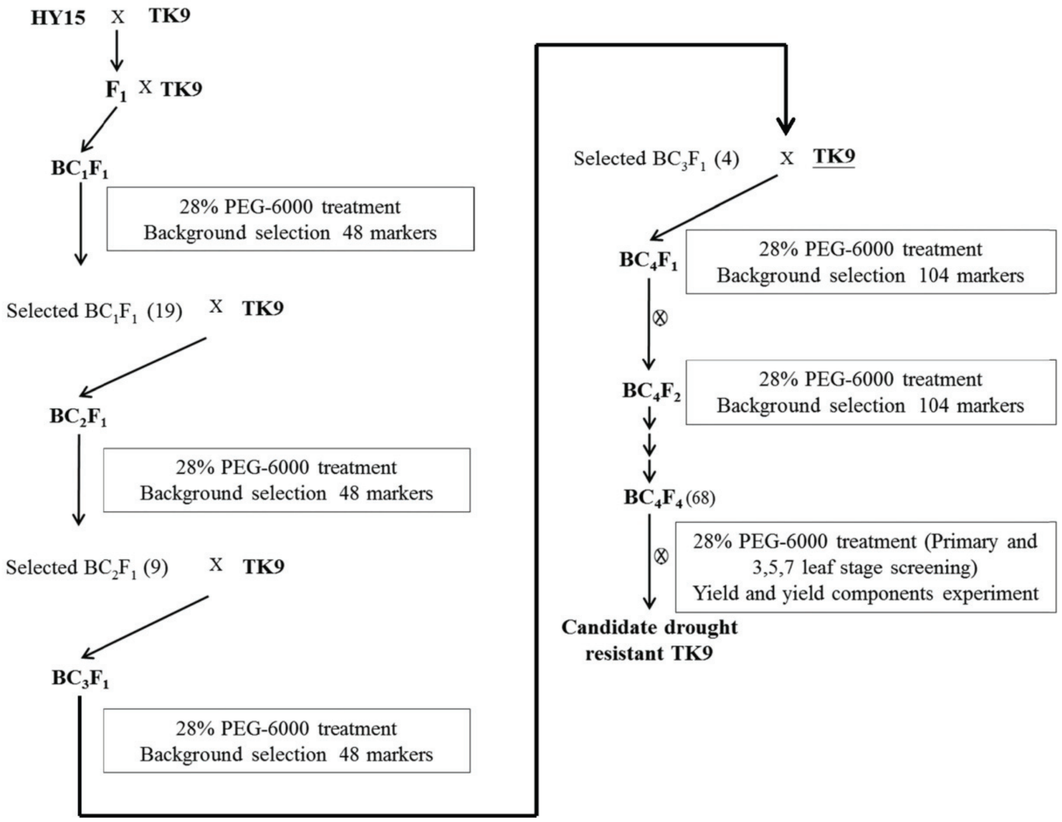

Fig. 1. The backcross breeding scheme for transfer the drought-tolerant trait of 'HY15' to 'TK9' by molecular marker selection, with details of the treatment of 28% PEG-6000 and markers used for background selection. The numbers of plants selected in each generation are indicated in parentheses.

品系旱田實用性之評估：品系產量比較試驗各品系分別收穫所得之 BC_4F_3 依譜系法再經一期繁殖成 BC_4F_4，2014 年一期作以 BC_4F_4 進行旱田實用性評估試驗。試驗採用順序排列，每一品系 4 行植，每行 8 株，行株距為 0.30 m × 0.15 m，4 重複，於成熟時收穫時，乾旱處理方式係各品系達分蘗盛期時進行乾旱斷水，待試驗品系內一半以上植株抽穗後再進行一次灌水，直至收穫不再灌水。而斷水乾旱期間，於五月初的抽穗時期時因遭遇梅雨，有減輕斷水乾旱處理之效果。同時期亦進行 BC_4F_4 幼苗期耐旱性之調查，試驗於網室以水耕液模式添加 28% PEG-6000 模擬缺水逆境處理進行。先依 BC_4F_4 幼苗期耐旱性之調查結果，選出耐旱等級最佳之前 12 個品系，再進行產量構成要素與小區稻穀產量之調查，本試驗所有材料之培育及種植，均於農業試驗所嘉義分所水稻試驗田區進行，其田間管理按一般慣行法進行。

二、耐旱性之評估

水稻秧苗期模擬缺水之耐旱試驗處理與耐旱等級評估

水稻種子先以稀釋 1,000 倍的免賴得(benomyl)粉劑於培養皿中浸種消毒 24 h，爾後每日換水並置於烘箱內以 30℃催芽，待種子皆萌芽後，移至溫室中點播於 0.50 m × 0.60 m 之 80 孔水耕盤進行水耕栽培，使用改良木村式 B 式水耕液配方(Yoshida *et al.* 1976)。種子點播入水耕盤時使用 0.5 倍水耕液，幼苗生長至一葉齡後更換為 1 倍水耕液，

三葉齡時則更換為 1.5 倍水耕液。待點播約 14 d 後幼苗平均 3-4 葉齡時，將水耕液更換成含 28% PEG-6000 之 1.5 倍水耕液，進行水稻幼苗期模擬缺水試驗。模擬缺水試驗處理後，每天進行單株調查，水稻幼苗期乾旱等級表現，調查標準引用國際水稻研究所訂定之水稻乾旱分級標準(Standard Evaluation System: IRRI 1996)，依照水稻幼苗葉片捲曲及乾枯程度進行 0 (未處理)、1 (最耐旱)、3、5、7 及 9 (最不耐旱)不同等級之判定(Fig. 2)。耐旱試驗處理係以缺水敏感型對照品種‘IR64’的耐旱等級表現，作為‘HY15’、‘TK9’及回交後代的復水標準，當‘IR64’幼苗的乾旱等級平均達 7 級，判定該耐旱試驗處理當下即為‘IR64’到達臨界凋萎點，此時復水後‘IR64’植株也不會復原存活。而復水前先調查並開始記錄乾旱等級，復水則每天一次紀錄幼苗模擬缺水處理後之復原能力調查，藉此區別參試材料幼苗期之耐旱能力。‘HY15’與‘TK9’透過 PEG-6000 篩選顯示，‘HY15’與‘TK9’在葉片會呈現捲曲反應，屬避旱性特性，惟葉片乾枯情形‘HY15’較‘TK9’為和緩，若在耐旱等級為 7 以上復水，‘IR64’與‘TK9’植株會持續乾枯死亡，‘HY15’則可回復生長。

耐旱品系不同發育時期耐旱性之調查

分子標幟輔助篩選並依譜系法繁殖所得之 BC_4F_4 68 個品系，於當世代進行耐旱性篩選，每品系試驗三重覆，依結果選出耐旱等級表現前十的品系；進一步在三葉齡、五葉齡及七葉齡等 3 個水稻不同生長階段進行水分逆境處理，並以耐旱品系‘HY15’與敏感型‘IR64’及‘TK9’做為對照，利用前述 80 孔水耕盤於不同發育階段以水耕方式進行 28% PEG-6000 水耕液模擬缺水逆境處理，唯缺水處理過程不進行復水操作，而各發育時期之處理，每一品系均以 6 株水稻幼苗為一重複單位，試驗三重複，以逢機完全區集設計(RCBD)排列，並於植株間表現出差異之起始點開始至植株接近死亡階段，每日進行耐旱等級調查。

統計分析

試驗中統計分析使用 Microsoft Office Excel 2010 套裝軟體，依照 Lu *et al.* (2006)之分析方法，對試驗中產量構成要素和各葉齡處理天數先進行變方分析，並於有顯著差異之項目再以最小差異顯著性(LSD)測驗(α = 0.05)進行品系間比較。

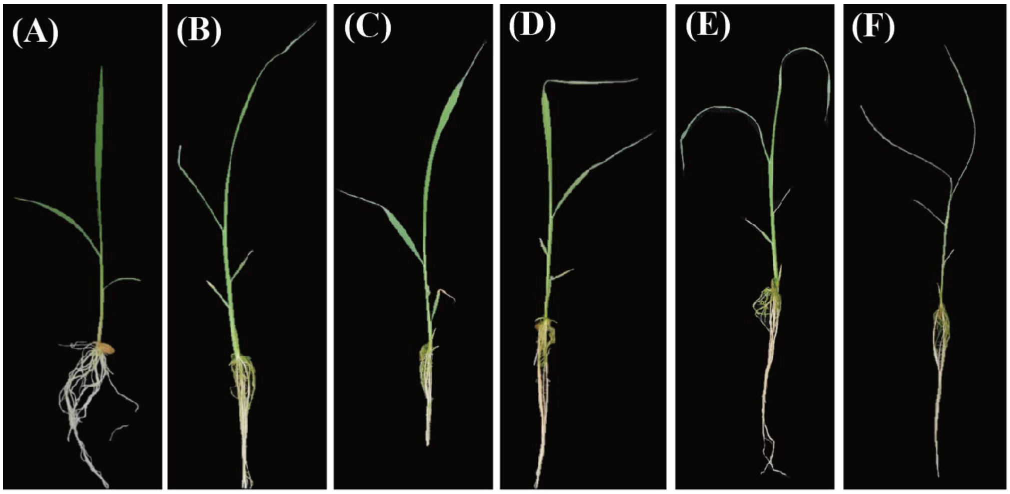

Fig. 2. The different scales of rice morphology in response to drought treatment. (A)-(F) Rice was treated with drought during 3-leaf seeding and scaled as 0: none treatment. 1: Some leaves are rolled or discolored. 3: Some leaves tips are drying. 5: About 1/2 leaves of the plant are drying. 7: About 2/3leaves of the plant are drying. 9: The whole plants are almost dead and dried, respectively.

三、分子標幟輔助耐旱水稻選拔

水稻基因組 DNA 之萃取及多型性分子標幟篩選

水稻葉片基因體 DNA (genomic DNA) 萃取方式修改自 benzyl chloride 法 (Kazuhiro *et al.* 1998)，先取約 5 cm 鮮嫩葉片放入 2.0 mL 圓底離心管，並置入一顆鋼珠，以組織研磨機 Tissue-Lyser II (Qiagen, German)設定頻率至 30 Hz 震盪 2 min 研碎葉片。再加入 300 μL 之 Solution I (100 mM Tris-HCl，pH 9.0；40 mM EDTA，pH 8.0；1.67% SDS)和 150 μL 之 benzyl chloride (Acros, USA)後，置於 50℃水浴中 15 min；其後加入 150 μL 之 3 M NaOAc，緩慢搖晃使其均勻混合。在 4℃下以 15,000 rpm (21,380 × *g*)離心 15 min，取上清液至新的離心管，加入 700 μL 之 100%乙醇，緩慢混勻。以 15,000 rpm (2,1380 × *g*)離心 10 min 沉降 DNA，留下 DNA pellet，並加入 500 μL 之 70%乙醇，靜置 5 min，清洗鹽類。去除乙醇後，風乾 DNA。最後加入 100 μL 之 TE 緩衝液(10 mM Tris-HCl，pH 8.0；1 mM EDTA，pH 8.0)溶解 DNA。而分子標幟的挑選是先依據 Hsu *et al.* (2012)發表之多型性分子標幟資料，挑選輪迴親本'TK9'與'HY15'間具多型性的分子標幟進行分析，並額外自行設計之 SSR 及 Indel 分子標幟填補不足位置，SSR 來源根據水稻分子標幟資料庫網站，Gramene (http://www. gramene.org/ markers/microsat/)已公佈的 SSR 分子標幟序列(Supplementary Table 18, IRGSP, 2005)，Indel 的設計係根據 Shen *et al.* (2004)所發表 Indel 存在位置進行相關引設計。

PCR、電泳與基因型判讀

PCR 反應總體積為 10 μL，包含約 20 ng 的 DNA、0.2 μM 的引子、1 倍 T*aq* DNA Polymerase Master Mix Red (75 mM Tris-HCl, pH8.5, 20 mM $(NH_4)_2SO_4$, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.1% Tween 20®, 0.2 mM dNTPs, 0.05 units mL^{-1} Ampliqon *Taq* DNA Polymerase, red dye, stabilizer) (Ampliqon, Denmark)和 ddH_2O，使用核酸增殖儀 Labcycler (Sensoquest, German)進行反應，PCR 流程設定 94℃為 2 min，一個循環；94℃為 30 s，55℃為 20 s，72℃為 30 s，共 35 個循環；72℃為 2 min，一個循環；最後結束在 20℃。PCR 擴增之 DNA 產物以 6% 1.5 mm non-SDS PAGE (non- SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis)進行 PCR 產物分離。膠體製作使用四片注膠器 GCC-204-33 (C.B.S. Scientific®, CA)，配方為 110 mL 1 x TBE (Amresco®, USA)、77 mLR.O. water、33 mL 的 40% 19:1 ACRYL/BIS™ (Amresco®, USA)、0.1% APS (Amresco®, USA)，最後添加 176 μL TEMED (Amresco®, USA)，靜置約 1 h 即可充分凝膠。電泳槽使用超寬型雙面直立式迷你電泳裝置 MGV-202-33 (C.B.S. Scientific®, CA)，一個電泳槽一次可進行兩片(每片 102 個 well)膠體電泳，電泳緩衝液使用 0.5 x TBE。膠片中 well 均加入 1 μL 的各樣品 PCR 產物，並使用 100 V 進行 60 h 電泳，即可適當地分離 PCR 產物。電泳結束後將膠片卸下，置於含 10 μL SYBR® Safe DNA gel stain (Life technologies®, USA)的 200 mL R.O.逆滲透水中，輕搖 5 min 進行膠片外染，再放到暗箱中以 UV 光使 DNA 條帶顯影並照相記錄。經電泳分析 PCR 產物，比較親本和子代擴增 DNA 片段大小，當只出現一個 DNA 條帶並與'HY15'相同，此子代為同型合子，將其基因型紀錄為 A；當只出現一個 DNA 條帶並與'TK9'相同，此子代也為同型合子，將其基因型紀錄為 B；同時出現兩個 DNA 條帶且與兩親本相同，此子代為異型合子，將此基因型紀錄為 H。基因型判讀工作採用人工判讀方式，避免來自電腦程式的誤判導致基因型評估錯誤。另外在 BC_1- BC_4 世代之 F_1 回交子代植株，基因型分析中只會出現同型

合子 B 或異型合子 H，如出現同型合子 A 的基因型，則視為自交種子並淘汰該單株。

繪製連鎖圖譜

利用專一性引子將目標片段擴增，並以電泳系統將擴增片段加以分離，挑選出在兩個輪迴親與貢獻親間具備多型性的分子標幟，使用 RAP-DB 網站提供 IRGSO/RAP build 5 版 BAC/PAC 位置，轉換成在 IRGSP (International Rice Genome Sequencing Project)網站 Build 5 版所公布的連鎖圖譜位置，並將結果利用 GGT 2.0: graphical genotypes/2007 edition 軟體(http://www.wageningenur.nl/)進行分析，並將用於輔助選拔之分子標幟的連鎖圖譜繪出。

結果

一、分子標幟輔助耐旱水稻之選育回交世代之分子標幟背景選拔

BC_1F_1 世代之秧苗經模擬缺水逆境處理後，由於因存活株數過少，故此一世代乃不進行分子標幟背景選拔，直接移植田間栽培，並於抽穗時期供建立 BC_2F_1 之回交母本。從存活植株中共挑選出 16 株 BC_2F_1 植株，利用分布在水稻 12 條染色體上，共 48 個分子標幟進行背景選拔，包括 30 個 SSR、4 個 STS 及 14 個 indel 分子標幟(Table 1、Fig. 3)，結果 16 株 BC_2F_1 植株與‘TK9’的遺傳相似度介於 81-97%之間，平均約為 86.2% (Fig. 4)，其中與‘TK9’的遺傳相似度較高之 9 株，分別為

Table 1. The number of polymorphic markers between ‘TK9’ and ‘HY15’ used in background selection.

Backcross generation	Chromo-some	Genetic marker				Backcross generation	Chromo-some	Genetic marker			
		SSR	STS	Indel	Subtotal			SSR	STS	Indel	Subtotal
BC_2	1	3	0	1	4	BC_4	1	8	1	2	11
	2	3	1	0	4		2	6	1	3	10
	3	3	0	1	4		3	7	1	2	10
	4	3	0	1	4		4	3	0	6	9
	5	2	1	1	4		5	6	0	3	9
	6	4	0	0	4		6	6	0	3	9
	7	2	1	1	4		7	3	0	5	8
	8	1	1	2	4		8	3	0	4	7
	9	2	0	2	4		9	3	2	2	7
	10	2	0	2	4		10	5	0	2	7
	11	2	0	2	4		11	5	0	4	9
	12	3	0	1	4		12	7	0	1	8
	Total	30	4	14	48		Total	60	5	37	104
BC_3	1	3	1	0	4						
	2	2	0	2	4						
	3	4	0	0	4						
	4	1	0	3	4						
	5	4	0	0	4						
	6	2	0	2	4						
	7	1	0	3	4						
	8	2	0	2	4						
	9	3	1	0	4						
	10	3	0	1	4						
	11	2	2	0	4						
	12	3	0	1	4						
	Total	30	4	14	48						

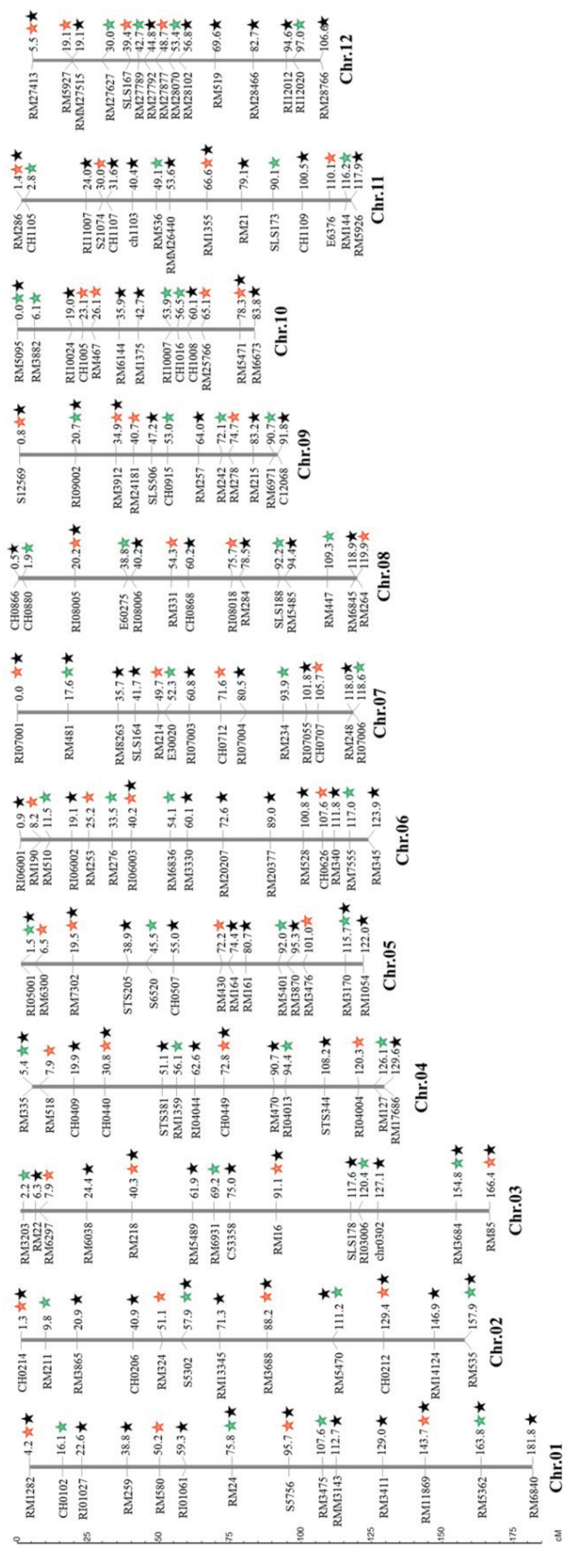

Fig. 3. **The polymorphic markers used for background selection. Forty-eight markers indicated by green stars and forty eight markers indicated by orange stars were applied to BC_1F_1, BC_2F_1, BC_3F_1. One hundred and four markers indicated by black stars were applied to BC_4F_1 and BC_4F_2 for background selection. The prefixes RM indicates SSR markers; C, E and S indicate STS markers; CH, STS, SLS and RI indicate Indel markers.**

97.1、89.3、89.2、89.0、88.1、87.8、85.9、85.5 與 84.8%，進一步移植於田間栽培，並於抽穗期供建立 BC_3F_1 之回交母本使用。同樣在 BC_3F_1 回交後代，由缺水逆境篩選出的 18 株；由 48 個分子標幟(Table 1、Fig. 3)進行背景選拔，結果 18 株 BC_3F_1 與'TK9'的遺傳相似度介於 93–99.8%之間，平均約 91.6% (Fig. 4)，其中有 4 株與'TK9'的遺傳相似度較高，皆高於 95%，挑選此 12 株供做建立 BC_4F_1 之回交母本。在 BC_4F_1 經水分逆境處理後，為達涵蓋整個水稻基因體的背景選拔效果，故挑選 104 個分布於水稻 12 條染色體上的多型性分子標幟，包括 60 個 SSR、5 個 STS 及 37 個 Indel 分子標幟，以此 104 個分子標幟進行 BC_4F_1 回交後代之背景選拔(Table 1、Fig. 3)，結果顯示，耐旱 BC_4F_1 後代與'TK9'的遺傳相似度平均達到 94.5% (Fig. 4)，並全部進行自交建立 BC_4F_2，延續 BC_4F_1 所使用之 104 個分子標幟再進行一次背景選拔。結果顯示，在所獲得之 BC_4F_2 回交後代與'TK9'的遺傳相似度平均為 93.0%，其中有 3 株幼苗之遺傳相似度高達 98%以上(Table 2、Fig. 4)。

二、耐旱品系不同發育時期耐性之評估

由分子標幟輔助選種所得之 68 個 BC_4F_4 品系，經水分逆境篩選出耐旱等級前十名之品系，分別於三葉齡、五葉齡及七葉齡等 3 個時期進行耐旱性評估，藉以確認耐旱品系在不同發育時期之耐旱性穩定性。結果如 Table 3 所示，在三葉齡時期在處理後第 1 天各品系在耐旱等級表現上便能明顯區分，故開始進行植株耐旱等級調查直至第 7 天(Fig. 5A)，以植株表現的耐旱等級取平均值，發現品系 DT17 和 DT60 之外，其餘部分品系在水分逆境處理下第 4 天已達到 5 級，而在處理後第 7 天所有品系則皆達到 7 級以上；經由變方分析結果顯示，各品系間耐旱表現之差異在第 2、4、5 和 7 天達顯著水準(Table 3)。

在五葉齡時期，由於處理期間天氣高溫加上試驗地點處於網室，使得所有試驗植株在耐旱等級表現上，在處理後第 2 天葉片即出現水分逆境處理反應差異，故開始進行耐旱等級調查，調查植株耐旱等級直至第 9 天 (Fig. 5B)，而在第 5 天，所有品系除 DT3 和 DT39 外，皆達 7 級以上，且輪迴親 TK9 則達到了 8 級，並在第 8 天，所有品系皆達到 7 級以上；經由變方分析結果顯示，品系間耐旱表現差異達顯著水準，分別在第 2、3、4、6、7 和 8 天均有顯著差異，並繼續進行多重比較，結果發現以 DT3 耐旱性表現最佳，而 DT17、DT39 和 DT60 也是偏向表現較佳的耐旱特性(Table 3)。

在七葉齡時期，植株在處理後第 2 天即開始進行耐旱等級調查，調查每 1 天的植株耐旱等級直至第 11 天(Fig. 5C)，所有品系在第 8 天皆達到 5 級以上，在第 10 天達到 7 級以上；經由變方分析結果顯示，品系間耐旱表現差異在處理後第 8、9、10 和 11 天達顯著水準，同樣再經多重比較結果發現以 DT3 和 DT39 耐旱性表現最佳(Table 3)，而三個葉齡在各自調查耐旱等級表現最佳的都是不同

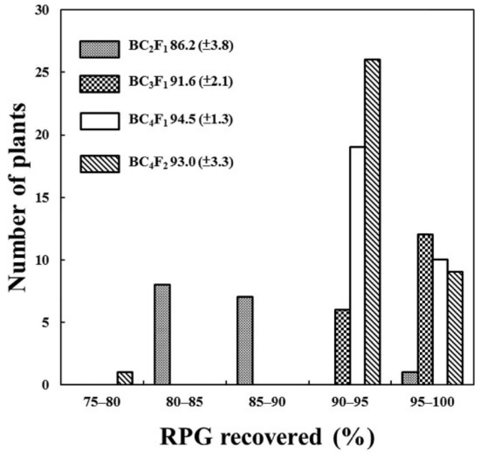

Fig. 4. **The frequency distribution of recurrent parent genome (RPG) recovered rate using marker-assisted backcrossing in BC_2F_1, BC_3F_1, BC_4F_1 and BC_4F_2 population derived from the backcross of 'TK9'/'HY15'. The numbers inside the right side of frame indicate the mean values of RPG recovered (±SD) in each generation.**

Table 2. The genome composition of BC_4F_2 by 104 polymorphic markers used for MAS.

Individual[z]	A(%)[y]	B(%)[x]	H(%)[w]	- (%)[v]	RPG recovered (%)	Total (cM)	Recombinant[u]	H-segment[t]
TK9	0	100	0	0	100	1489.1	0	0
37-29	0	99.4	0.6	0	99.7	1489.1	1	1
75-13	0	97.6	2.4	0	98.8	1489.1	4	2
86-6	0	97.2	2.8	0	98.6	1489.1	3	2
1-8	0	91.3	8.7	0	95.7	1489.1	8	4
61-14	2.9	93.8	3.3	0	95.5	1489.1	5	2
9-7	0.8	91.6	7.6	0	95.4	1489.1	10	5
11-17	0	91.6	7.2	1.1	95.2	1489.1	9	4
6-7	1.3	92.2	5.8	0.7	95.1	1489.1	8	3
87-28	3.4	93.5	3	0	95.0	1489.1	8	3
9-1	0	88.4	11.6	0	94.2	1489.1	8	4
48-29	0	89.4	9.6	1	94.2	1489.1	10	4
37-17	1.8	90.6	6.4	1.2	93.8	1489.1	9	3
73-30	3.2	90.8	6	0	93.8	1489.1	9	3
9-17	2.5	89.9	7.6	0	93.7	1489.1	9	4
11-4	4.3	91.6	4.1	0	93.7	1489.1	5	1
7-3	3.6	90.4	6	0	93.4	1489.1	8	3
7-17	2.5	89.1	8.4	0	93.3	1489.1	9	3
86-10	3.7	91.8	3	1.4	93.3	1489.1	6	2
35-1	3.7	90	5.3	1	92.7	1489.1	8	3
24-11	6.2	91.2	2.6	0	92.5	1489.1	6	2
24-7	4.9	89.7	5.4	0	92.4	1489.1	8	3
24-12	2.5	88.5	7.8	1.2	92.4	1489.1	11	4
7-2	1.6	87.3	9.9	1.2	92.3	1489.1	15	7
31-22	4.5	90	4.4	1.2	92.2	1489.1	7	1
47-21	7.4	91.6	1	0	92.1	1489.1	5	1
75-17	3.4	89.6	4.8	2.2	92.0	1489.1	13	3
61-5	3.4	89.1	5.5	1.9	91.9	1489.1	11	3
9-15	2.4	85.9	11.7	0	91.8	1489.1	10	4
87-17	5.8	89.2	5	0	91.7	1489.1	11	4
87-29	6.9	90.6	1.2	1.3	91.2	1489.1	10	1
73-2	4.8	86.7	7.8	0.6	90.6	1489.1	9	4
23-6	7.8	90.2	0.6	1.4	90.5	1489.1	7	1
73-5	3.9	86.9	6.8	2.4	90.3	1489.1	14	4
9-2	6	86.5	7.5	0	90.3	1489.1	8	3
48-3	1.1	82.6	15	1.3	90.1	1489.1	9	4
1-7	1.8	62.7	34	1.4	79.7	1489.1	30	13
HY15	100	0	0	0	0	1489.1	0	0

[z] Variety name (Arrangement by the percent of RPG recovered.)
[y] The percent of Hang-Yu 15 ('HY15') genome.
[x] The percent of recurrent parent genome.
[w] The percent of heterozygote.
[v] The percent of missing data.
[u] The frequency of cross-over happened in chromosome segment.
[t] Amount of heterozygote in all markers.

Table 3. The scale of drought-tolerance for 'HY15', 'TK9', 'IR64' and ten drought-tolerant lines by the treatment of 28% PEG-6000 at different seedling stages.

Stage	Line or variety	Scale of drought-tolerance[z] Days after treatment										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Three-leaf stage	HY15	3.0	4.6 a	4.9	6.6 a	7.7 a	8.4	8.6 ab				
	TK9	2.7	4.2 ab	4.7	6.3 ab	7.4 ab	8.3	8.7 a				
	IR64	2.2	3.8 ab	4.0	6.3 ab	7.8 a	8.1	8.8 a				
	DT3	2.2	3.8 ab	4.0	5.3 abc	6.2 bc	7.2	7.7 abc				
	DT17	2.2	3.6 b	4.1	4.7 c	6.0 c	6.9	7.6 abc				
	DT22	1.9	4.0 ab	4.1	5.1 bc	5.9 c	7.1	7.9 abc				
	DT38	2.4	4.4 ab	4.6	5.9 abc	6.3 bc	7.3	8.0 abc				
	DT39	2.3	4.1 ab	4.2	5.6 abc	6.9 abc	7.6	8.3 abc				
	DT46	2.0	3.7 ab	4.0	5.2 abc	6.2 bc	7.1	7.9 abc				
	DT56	2.4	4.2 ab	4.4	5.9 abc	7.3 ab	7.8	8.3 abc				
	DT60	1.8	3.6 b	3.8	4.9 bc	5.8 c	6.7	7.4 bc				
	DT61	2.3	3.9 ab	4.0	5.2 abc	6.6 abc	7.6	7.8 abc				
	DT65	2.1	3.9 ab	4.1	5.1 bc	5.9 c	6.8	7.3 c				
Five- leaf stage	HY15		4.1 abc	5.8 bcd	6.0 b	7.6	7.9 bc	8.2 bc	8.4 abc	8.6		
	TK9		4.2 ab	6.9 a	7.0 a	8.1	8.9 a	9.0 a	9.0 a	9.0		
	IR64		4.4 a	6.2 abc	6.2 b	7.7	7.9 bc	8.3 bc	8.8 a	9.0		
	DT3		3.1 d	5.2 d	5.0 c	6.6	6.7 d	6.9 d	7.3 e	8.6		
	DT17		3.9	5.9 bcd	5.8 b	7.2	7.8 bc	7.8 c	7.9 cde	8.9		
	DT22		4.0 abc	5.7 bcd	6.1 b	7.3	8.3 ab	8.7 ab	8.8 a	9.0		
	DT38		4.0 abc	5.8 bcd	5.7 b	7.3	7.8 bc	8.2 bc	8.4 abc	9.0		
	DT39		3.3 cd	5.4 cd	5.6 bc	6.9	6.9 d	7.0 d	7.7 de	8.8		
	DT46		4.0 abc	6.3 ab	6.1 b	7.6	8.0 bc	8.3 bc	8.7 a	9.0		
	DT56		3.9	5.8 bcd	6.0 b	7.2	7.7 bc	8.2 bc	8.4 abc	9.0		
	DT60		3.4 bcd	5.7 bcd	5.7 b	7.2	7.4 cd	7.8 c	7.9 cde	9.0		
	DT61		4.1 abc	6.2 abc	6.2 b	7.6	8.0 bc	8.4 abc	8.6 ab	9.0		
	DT65		3.9	5.8 bcd	5.9 b	7.7	7.9 bc	8.0 c	8.0 bcd	9.0		
Seven-leaf stage	HY15		2.0	3.9	4.8	4.7	5.1	6.1	7.2 ab	7.9 ab	8.9 a	9.0 a
	TK9		1.7	3.0	4.7	4.7	5.0	6.2	7.2 ab	7.7 ab	9.0 a	9.0 a
	IR64		1.4	3.1	4.2	5.6	6.4	7.0	8.1 a	8.6 a	9.0 a	9.0 a
	DT3		1.4	3.1	4.2	4.2	4.3	4.7	6.7 bc	6.9 bc	8.2 cde	8.4 bc
	DT17		1.3	3.2	4.2	4.1	4.6	4.9	6.3 bc	6.9 bc	8.2 cde	8.8 ab
	DT22		1.0	2.7	4.1	4.3	4.3	4.6	6.2 bc	6.9 bc	8.4 bcd	8.7 ab
	DT38		1.6	3.6	4.2	4.2	4.4	5.3	6.4 bc	7.0 bc	8.7 ab	8.8 ab
	DT39		1.2	3.0	4.0	4.1	4.4	4.8	5.6 c	6.3 c	7.8 e	8.2 c
	DT46		1.2	3.3	4.7	5.3	5.3	6.0	6.8 bc	7.2 bc	8.8 ab	8.9 a
	DT56		1.4	3.3	4.6	4.6	4.7	5.7	6.8 bc	7.1 bc	8.4 bcd	9.0 a
	DT60		1.0	3.0	4.3	4.7	4.9	5.1	6.2 bc	7.0 bc	8.1 de	8.8 ab
	DT61		1.1	3.0	4.1	4.2	4.7	4.9	6.3 cd	7.0 bc	8.6 abc	8.9 a
	DT65		1.1	3.2	4.2	4.7	4.7	5.3	6.6 bc	7.0 bc	8.1 de	8.8 ab

[z] Means with none or the same letter of a row are not significantly different at 5% level by least significant difference (LSD) test.

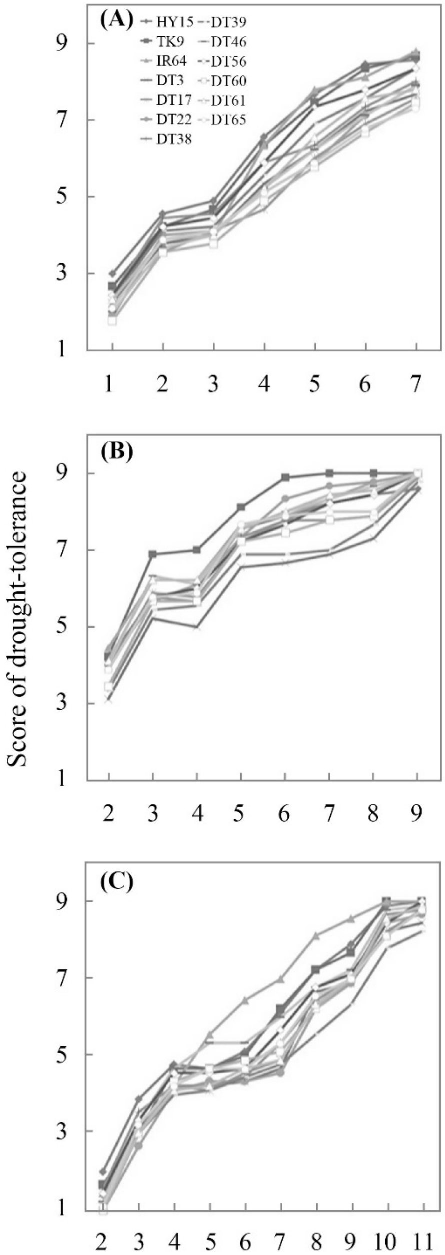

Fig. 5. The drought-tolerance scale evaluated in drought-tolerant cultivar 'HY15', drought-susceptible cultivar 'IR64', recurrent parent 'TK9' and ten BC_4F_4 drought-tolerant lines derived from the backcross of 'TK9'/'HY15' at three-leaf (A), five-leaf (B) and seven-leaf (C) stages under the treatment of 28% PEG-6000.

品系，但 DT3 在三個葉齡中，其耐旱性相對於其他品系，仍是偏向表現較佳的耐旱特性。

三、 耐旱品系產量比較與構成要素試驗品系產量比較試驗

在 BC_4F_1 世代經耐旱處理後存活的植株，移植於田間並經自交後進行單株收穫，並前後各加上親本共 72 品種(系)，於 2013 年一期進行品系產量比較試驗，結果如 Table 4 所示，親本為前後兩個收穫之平均，其稻穀產量表現先換算成每株稻穀收穫重量，再依一般田間種植每公頃 220,000 株數量加乘，得到每品系每公頃的產量，結果各品系產量介於 1,134–5,356 kg ha^{-1}，其中僅'HY15'和 DT49 二個稻穀產量高於 5,000 kg ha^{-1}，產量分別為 5,129 及 5,356 kg ha^{-1}，顯示為產量較高之品種(系)；而大多品系之稻穀產量僅為 1,000 - 3,000 kg ha^{-1}，包括輪迴親本'TK9'產量為 2,516 kg ha^{-1}。

品系旱田實用性之評估

初篩水稻秧苗期缺水耐受性之結果選出 12 個 BC_4F_4 耐旱品系為材料，於 2014 年一期利用旱田栽培模式進行耐旱品系成株期稻穀產量調查，結果發現在旱田栽培狀態下，以輪迴親本'TK9'當對照之稻穀產量指數為 100%，換算 12 個耐旱品系之稻穀產量指數則介於 14–206% (Table 5)，其中有 6 個耐旱品系之稻穀產量高於對照品種。顯示選出之 6 個耐旱品系於旱田栽培下，相較於輪迴親本有提升稻穀產量之效益，尤其耐旱品系 DT22 品系，其稻穀產量指數高於'TK9'對照品種 206.5% 以上，並與貢獻親'HY15'差異不顯著，顯示具有缺水耐受性及高產之潛能；另外，也發現有 6 個耐旱品系之稻穀產量指數低於對照品種，顯示這 6 個品系稻穀產量之表現受到缺水逆境嚴重影響，此 6 個耐旱品系應不具有成株期的缺水耐受性。

同樣從初篩水稻秧苗期缺水耐受性選出之前 12 耐旱品系調查其產量構成要素經變方

Table 4. The grain yield of 'HY15', 'TK9' and 68 drought-tolerant rice lines in yield trial at the first cropping season in 2013.

Line or variety	Grain yield (kg ha^{-1})	Line or variety	Grain yield (kg ha^{-1})	Line or variety	Grain yield (kg ha^{-1})
HY15	5129	DT23	2131	DT47	2434
TK9	2516	DT24	1458	DT48	3135
DT1	1286	DT25	3053	DT49	5356
DT2	1678	DT26	2537	DT50	4978
DT3	4159	DT27	3898	DT51	3183
DT4	3465	DT28	2661	DT52	2509
DT5	2503	DT29	2901	DT53	1870
DT6	1320	DT30	3273	DT54	1877
DT7	1162	DT31	3101	DT55	2276
DT8	1794	DT32	1870	DT56	2255
DT9	2592	DT33	2764	DT57	1471
DT10	2812	DT34	3004	DT58	2365
DT11	1705	DT35	1843	DT59	4606
DT12	1808	DT36	3658	DT60	2509
DT13	1822	DT37	1815	DT61	1348
DT14	2853	DT38	2826	DT62	2173
DT15	2138	DT39	2173	DT63	4091
DT16	3018	DT40	1636	DT64	1739
DT17	3059	DT41	4868	DT65	1863
DT18	2709	DT42	2853	DT66	4441
DT19	2207	DT43	2255	DT67	1134
DT20	3114	DT44	3383	DT68	3603
DT21	2173	DT45	2138		
DT22	4737	DT46	2324		

分析發現此期作所有參試材料在穗長、穗重、穗數、稔實率和千粒重等五個產量構成要素皆存在顯著差異(Table 6)，在穗長與千粒重性狀均偏向輪迴親本'TK9'，穗數則介於兩親本'TK9'和'HY15'之間，稔實率與穗重的部分，DT5、DT38、DT46、DT56 和 DT61 在稔實率與貢獻親'HY15'差異不顯著，而 DT22 在 12 個耐旱品系中擁有最大的穗重，並結合上述產量結果顯示，DT22 雖然在稔實率上稍低但擁有較高的穗重，且穗長、穗數和千粒重性狀與輪迴親'TK9'差異不顯著，使得穀粒產量潛能高於其它耐旱品系。

討論

分子標幟輔助選拔

試驗族群具有一定規模的狀況下，傳統回交育種之回交後代植株基因型，在各世代回復到輪迴親基因型的理論值為 BC_1- 75%、BC_2-87.5%、BC_3-93.8%及 BC_4-96.9%，但實際在育種的操作流程中，多因族群數量偏少或雜交親本遺傳背景較遠，使得各回交世代回復到輪迴親基因體的比率較理論值低(Collard *et al.* 2005)。另外傳統回交育種至少

需 6 至 8 次的回交，子代才能幾盡回復到輪迴親的基因體，但藉由分子標幟輔助回交育種，只需回交 4 次或 3 次，甚至將分子標幟選用的密度降於 10 cM 之內，2 次即可達到此目標(Collard *et al.* 2008, Xu and Crouch 2008)。

Neeraja *et al.* (2007)利用水稻基因圖譜上約 89 個分子標幟分析不同回交世代之植株，結果分子標幟輔助回交育種的輪迴親基因體回復比率在 BC_1 世代約 67.9%、BC_2 世代約 90.7%、BC_3F_1 世代約 96.2%、BC_3F_2 世代則有植株回復比率達 100%，另一學者 Kuo *et al.* (2013)同樣利用水稻基因圖譜上共 113 個分子標幟，進行不同回交世代之分析，回復比率為 BC_1 世代約 75%、BC_2 世代約 89%、BC_3 世代約 96.4%，本試驗雜交組合在 BC_2 世代各別為 86.2%、BC_3 世代為 91.6%；在 BC_4 世代回交 4 次的後代應已大多回復到接近輪迴親的基因體，所以為達到涵蓋整個水稻基因體的背景選拔，進而挑選至 104 個分

Table 5. The grain yield of 'HY15', 'TK9' and 12 drought-tolerant rice lines in yield trial in the first cropping season at 2014.

Line or variety	Grain yield (kg ha^{-1})	Yield index (%)
HY15	7039 ab	-
TK9	3713 efgh	100.0
DT3	1392 ij	37.5
DT5	5359 bcde	144.3
DT17	1467 ij	39.5
DT18	2328 ghi	62.7
DT22	7669 a	206.5
DT38	5536 bc	149.1
DT39	3181 fgh	85.7
DT46	3760 defg	101.3
DT56	5449 bcd	146.8
DT60	526 j	14.2
DT61	4161 cdef	112.1
DT65	2051 hij	55.2

[z] Means with the same letter of a row are not significantly different at 5% level by least significant difference (LSD) test.

Table 6. The yield components of 'HY15', 'TK9' and 12 drought-tolerant rice lines in the first cropping season at 2014.

Line or variety	Panicle length (cm)	Panicle weight (g)	Panicle number (No.)	Seed set (%)	1000-grain weight (g)
HY15	21.17 a	4.47 a	8.83 d	0.89 a	19.87 d
TK9	18.25 bc	1.22 fg	14.92 a	0.32 ef	25.82 ab
DT3	18.19 bcd	1.32 fg	12.00 bc	0.31 ef	25.79 ab
DT5	16.71 bcd	2.43 cde	12.17 bc	0.83 ab	26.16 ab
DT17	18.65 b	1.22 fg	11.92 bc	0.24 f	23.30 c
DT18	18.55 b	1.80 ef	11.42 bc	0.42 e	26.54 ab
DT22	18.76 ab	3.17 b	11.42 bc	0.75 bc	25.20 abc
DT38	15.82 d	2.51 bcd	12.83 abc	0.95 a	24.83 abc
DT39	18.19 bcd	1.88 def	15.08 a	0.63 cd	27.01 a
DT46	18.24 bcd	2.61 bc	11.92 bc	0.86 ab	24.48 bc
DT56	16.55 bcd	2.36 cde	13.33 ab	0.84 ab	25.40 abc
DT60	17.65 bcd	0.90 g	11.42 bc	0.20 f	25.62 ab
DT61	16.57 bcd	2.32 cde	11.17 bcd	0.88 ab	26.16 ab
DT65	16.12 cd	1.48 fg	10.42 cd	0.58 d	25.90 ab

[z] Means with the same letter of a row are not significantly different at 5% level by least significant difference (LSD) test.

子標幟進行分析各別為 BC_4F_1 世代 94.5%、BC_4F_2 世代則為 93%，各個回交世代皆低於理論值。顯示本試驗選用的雜交親本間遺傳背景可能較遠，致使但其中還是有單株達近100%回復率，而獲選之材料中已可挑選出植株幾乎回復至輪迴親基因體之後代。這些回交後代進一步繁殖成 BC_4F_3 世代，其後再利用譜系法將單株純化並剔除異型結合之植株而成固定品系，其後透過田間的旱田產量評估試驗，其獲選耐旱品系在缺水環境上之栽培實用性便可獲得印證。

耐旱品系不同葉齡時期耐旱性之評估

Kuo *et al.* (2013)利用'SM61'與'IR64'之回交後代，在三、五、七及最高分蘗期以 200 mM NaCl 溶液進行處理，顯示後代 ST12、ST18 及 ST59 品系的耐鹽表現較之對照品種'IR64'的表現均有明顯的差異。並因其貢獻親'SM61'於早期生長較慢，將'SM61'之耐鹽特性導入背景為秈稻的回交品系下，生長勢及根系獲得改善，使得品系有超越親本之現象。檢視本試驗參試 10 個品系的耐旱表現來看，在三、五、七葉齡水分逆境處理結果，顯示 DT3 和 DT39 等 2 個品系在苗期有不錯且較穩定之耐旱性表現，與對照品種'IR64'及輪迴親'TK9'的表現在五及七葉齡有達顯著差異，而在試驗中各品系與輪迴親間的生長勢並無發現差異，因此就各獲品系在苗期耐旱表現已顯著優於輪迴親來看，本試驗利用分子標幟輔助導入耐旱性頗為成功，各耐旱品系之耐旱表現推論因係'HY15'的耐旱基因導入'TK9'所造成之結果。

耐旱品系產量與構成要素評估試驗

學者指出水稻幼苗期與生長盛期對乾旱逆境之反應有所不同(Jongdee *et al.* 2002, Gowda *et al.* 2011, Shih *et al.*, 2012)，而 Wu (2013)利用 PEG-6000 篩選 9 個於幼苗期具缺水耐受性之突變品系，在水泥槽進行缺水逆境處理，其中 6 個品系在成株期較具缺水耐受性，另外 3 個品系則反應敏感，又近年利用乾旱逆境下穀粒產量作為耐旱篩選指標逐漸獲得學者認可，其能有效的反應缺水環境下水稻之耐旱性(Blum *et al.* 1999, Babu *et al.* 2003, Lanceras *et al.* 2004, Kumar *et al.* 2008, Venuprasad *et al.* 2008)。本研究利用旱田水分管理模式，探討經幼苗期 PEG-6000 篩選(前景選拔)及分子標幟輔助背景選拔所得之 12 個回交品系在成株期之田間耐旱性差異，試驗結果顯示有 6 個品系之稻穀產量高於輪迴親本，具有乾旱環境下維持一定產量的潛力，而亦有 6 個品系產量低於輪迴親本，其中 DT22、DT38 和 DT56 與輪迴親在旱田水分管理下穀粒產量有顯著的差異，顯示此 3 個品系在幼苗期與成株期均有缺水逆境的耐受性，尤其 DT22 之穀粒產量與'HY15'差異不顯著。可知在導入'HY15'基因體的回交過程中，其導入之遺傳因子會對稻穀產量表現出正或負面之影響，同樣的影響也出現在品系產量比較試驗，68 個品系中有 13 個品系之稻穀產量高於輪迴親本，其餘 56 個品系則低於輪迴親本。

學者也指出在乾旱逆境下，有一個至多個性狀會影響著稻穀產量及產量潛力，如分蘗數、穗數及稔實穀粒數等性狀，使得後代族群的產量潛力受到影響，被視為在乾旱逆境下保持產量的重要因素(Serraj *et al.* 2009, Dixit *et al.* 2014)，Liu *et al.* (2006)使用短根系秈稻'IR64'以抽穗當天前後−17、−7、0、10 和 20 天斷水乾旱處理，在-7 和 0 天的條件下對產量影響最大；在抽穗期進行 6 天的缺水環境下，'IR64'在稔實率方面減少 80%，遠低於深根型粳稻'Moroberekan'只下降 22%的表現，觀察雄雌蕊的變化。結果顯示，由於'IR64'在花藥的開裂程度與柱頭上之花粉密度相對較低，是造成產量損失的主因。本試驗調查 12 個回交品系之產量構成要素，顯示導入'HY15'基因體之回交後代改變單株穗數及穗重之農藝性狀，穗長（除 DT38）與千粒重均與輪迴親差異不顯著，而 DT5、DT38、DT46、DT56 和 DT61 等 5 個回交品系與

‘HY15’之稔實率亦差異不顯著，且其穗數較‘HY15’多，維持了稻穀產量潛能，故此 5 個品系在成株期應亦具有缺水逆境的耐受性。唯獨對照旱田水分管理的產量來看，在本試驗中參試品系在穗數全部低於輪迴親本，千粒重差異不顯著，但 DT5、DT38 和 DT56 等三個品系穗長較輪迴親短 2 公分顯示在分子標幟輔助選拔過程，這些品系之穗長及穗數控制的遺傳因子可能有一部份發生丟失，致使得產量潛能無法像 DT22 般有效發揮；另外，穗重間接代表每穗的稔實穀粒數量多寡，雖然高產量潛能品系在穗重較輪迴親本重，但較貢獻親‘HY15’輕，因此在選拔過程中可能亦丟失部份貢獻親穗重的豐產特性，導致穀粒產量潛力降低，而品系 DT22 在穗長與千粒種特性與輪迴親本差異不顯著，但保有一定的稔實率及穗重較重的特性，此乃使得產量潛能高於輪迴親及其它品系，達到與貢獻‘HY15’無顯著差異之稻穀產量潛力。

上述耐旱品系旱田產量評估結果顯示可藉由回交育種方式快速育成耐旱品系，然從選育出的 12 個品系材料中已有 DT5、DT22、DT38 和 DT56 等 4 品系在旱田缺水處理栽培下，其稻穀產量在 5,300 kg ha^{-1} 以上，達到旱田環境下之實用栽培價值，顯示在前期篩選流程中能保有一定比例植株在全生育期有較佳之耐旱境能力，未來國內可利用此方式在進行水稻耐旱境育種，藉由分子標幟輔助的快速選拔效率，將可於 4-5 年內改良國內現有栽培之優質水稻推薦品種的耐旱特性，因應極端氣候下在糧食生產的需求。再者在耐旱品系(BC_4F_4)於不同葉齡時期耐旱性評估試驗中，耐旱等級表現較佳之品系 DT3 與 DT39，其在旱田產量評估上不如預期，顯示了不同品系缺水逆境下之幼苗期與成株期對缺水反應並不相同，即可能不同發育時期的耐旱性控制機制會有不同，此結果也與其他學者結果相符(Jongdee *et al.* 2002, Shih *et al.*, 2012, Wu 2013)。因此進行耐旱性育種時，應先利用 PEG-6000 進行的模擬缺水逆境處理，篩選出幼苗期具耐旱性之後代，其獲選之材料再於田間進一步評估成株期缺水逆境的耐受性，如此便可選育出全生育期均具耐缺水逆境之優良品系。而本研究利用分子標幟輔助回交與搭配幼苗期模擬缺水逆境處理的方式，結果顯示可有效進行耐旱性之轉移及選育工作，因此可提供國內未來於水稻耐旱育種之參考。

引用文獻

Babu RC, BD Nguyen, V Chamarerk, P Shanmugasundaram, P Chezhian, P Jeyaprakash, SK Ganesh, A Palchamy, S Sadasivam, S Sarkarung, LJ Wade, HT Nguyen (2003) Genetic analysis of drought resistance in rice by molecular markers: association between secondary traits and field performance. **Crop Sci.** 43:1457–1469.

Blum A, J Mayer, G Golan, B Sinmena (1999) Drought tolerance of a doubled haploid line population of rice in the field: genetic improvement of rice for water-limited environments. p.310–330. *In*: Genetic Improvement of Rice for Water-limited Environments. December 1-3, 1999. Los Banos, Philippines. Published by IRRI.

Bruinsma J (2009) The resource outlook to 2050: by how much do land, water and crop yields need to increase by 2050? FAO, Rome. 33pp.

Collard B, C Vera Cruz, KL McNally, P Virk, D Mackill (2008) Rice molecular breeding laboratories in the genomics era: current status and future considerations. **Intl. J. Plant Genomics** 2008: 1–25.

Collard BC, DJ Mackill (2008) Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. **Philos. Trans. R. Soc. B** 363:557–572.

Collard BCY, MZZ Jahufer, JB Brouwer, ECK Pang (2005) An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. **Euphytica** 142:169–196.

Dixit S, A Singh, A Kumar (2014) Rice breeding for high grain yield under drought : astrategic solution to a complex problem. **Intl. J. Agron.** 2014: 1–15.

Evenson RE, D Gollin (2003) Assessing the impact

of the green revolution, 1960 to 2000. **Science** 300:758–762.

Fukai S, G Pantuwan, B Jongdee, M Cooper (1999) Screening for drought resistance in rainfed lowland rice. **Field Crops Res.** 64:61–74.

Gowda VRP, A Henry, A Yamauchi, HE Shashidhar, R Serraj (2011) Root biology and genetic improvement for drought avoidance in rice. **Field Crops Res.** 122:1–13.

Hsu JH, YR Lin, CW Kuo, YP Wu (2012) Establishing the platform of polymorphic markers for rice. (in Chinese with English abstract) **Crop Environ. Bioinform.** 9:137–159.

Hu J, M Cheng, G Gao, Q Zhang, J Xiao, Y He (2013) Pyramiding and evaluation of three dominant brown planthopper resistance genes in the elite indica rice 9311 and its hybrids. **Pest Manage. Sci.** 69: 802–808.

IRGSP (2005) The map-based sequence of the rice genome. **Nature** 436: 793-800.

IRRI (1996) Drought sensitivity. p.37–38. *In*: Standard Evaluation System for Rice. International Rice Research Institute. Los Banos, Philippines.

Jiang H, Y Feng, L Bao, X Li, G Gao, Q Zhang, J Xiao, C Xu, Y He (2012) Improving blast resistance of Jin 23B and its hybrid rice by marker-assisted gene pyramiding. **Mol. Breed.** 30:1679–1688.

Jongdee B, S Fukaib, M Cooper (2002) Leaf water potential and osmotic adjustment as physiological traits to improve drought tolerance in rice. **Field Crops Res.** 76:153–163.

Kazuhiro K, Y Niwa, T Yamaguchi, H Sunohara, H Hirano, M Umeda (1998) A rapid and easy-handling procedure for isolation of DNA from rice, Arabidopsis and tobacco. **Plant Biotechnol.** 15:45–48.

Khush GS (2001) Green revolution: the way forward. **Nat. Rev. Genet.** 2:815–822.

Kumar A, J Bernier, S Verulkar, HR Lafitte, GN Atlin (2008) Direct selection for yield, response to selection and use of drought-tolerant donors in upland and lowland-adapted populations. **Field Crops Res.** 107:221–231.

Kuo SC, CW Kuo, L YR, YP Wu (2013) Marker-assisted selection of salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). (in Chinese with English abstract) **J. Taiwan Agric. Res.** 62:137–156.

Lanceras JC, GPantuwan, B Jongdee, TToojinda (2004) Quantitative trait loci associated with drought tolerance at reproductive stage in rice. **Plant Physiol.** 135:384–399.

Liu JK, DQ Liao, R Oane, L Estenor, XE Yang, ZC Li, J Bennett (2006) Genetic variation in the sensitivity of anther dehiscence to drought stress in rice. **Field Crops Res.** 97:87–100.

Luo LJ (2010) Breeding for water-saving and drought-resistance rice (WDR) in China. **J. Exp. Bot.** 61:3509–3517.

Maclean JL, DC Dawe, B Hardy, GP Hettel (2002) Source Book for the Most Important Economic Activity on Earth. CABI Press**,** Wallingford, Oxon. 153pp.

Neeraja CN, R Maghirang-Rodriguez, A Pamplona, S Heuer, BC Collard, EM Septiningsih, G Vergara, D Sanchez, K Xu, AM Ismail, DJ Mackill (2007) A marker-assisted backcross approach for developing submergence-tolerant rice cultivars. **Theor. Appl. Genet.** 115:767–776.

Pantuwan G, S Fukai, M Cooper, S Rajatasereekul, JC O'Toole (2002) Yield response of rice (*Oryza sativa* L.) to drought under rainfed lowlands: 3. plant factors contributing to drought resistance. **Field Crops Res.** 73:181–200.

Price A, B Courtois (1999) Mapping QTLs associated with drought resistance in rice: progress, problems and prospects. **Plant Growth Regul.** 29:123–133.

Serraj R, A Kumar, KL McNally, I Slamet-Loedin, R Bruskiewich, R Mauleon, J Cairns, RJ Hijmans (2009) Improvement of drought resistance in rice. **Adv. Agron.** 103:41–99.

Shen YJ, H Jiang, JP Jin, ZB Zhang, B Xi, YY He, G Wang, C Wang, L Qian, X Li, QB Yu, HJ Liu, DH Chen, JH Gao, H Huang, TL Shi, ZN Yang (2004) Development of genome-wide DNA polymorphism database for map-based cloning of rice genes. **Plant Physiol.** 135:1198–1205.

Shih CL, RK Chen, CN Tsai, PH Liu, JC Lo, WL Huang (2012) Correlation analysis for drought tolerance between seedling stage and active tillering stage in rice. (in Chinese with English abstract) **J. Agric. For.** 9:55–69.

Steele KA, AH Price, HE Shashidhar, JR Witcombe (2006) Marker-assisted selection to introgress rice QTLs controlling root traits into an Indian upland rice variety. **Theor. Appl. Genet.** 112:208–221.

Steele KA, DS Virka, R Kumar, SC Prasad, JR Witcombe (2007) Field evaluation of upland rice lines selected for QTLs controlling root traits. **Field Crops Res.** 101:180–186.

Steele KA, AH Price, JR Witcombe, R Shrestha, BN Singh, JM Gibbons, DS Virk (2013) QTLs associated with root traits increase yield in upland rice when transferred through marker-assisted selection. **Theor. Appl. Genet.** 126:101–108.

Swamy BP, A Kumar (2013) Genomics-based precision breeding approaches to improve drought tolerance in rice. **Biotechnol. Adv.** 31:1308–1318.

Thomson MJ, Md Ocampo, J Egdane, MA Rahman, A Sajise, DL Adorada, E Tumimbang-Raiz, E Blumwald, ZI Seraj, RK Singh, GB Gregorio, AM Ismail (2010) Characterizing the saltol quantitative trait locus for salinity tolerance in rice. **Rice** 3:148–160.

Toorchi M, HE Shashidhar, TM Gireesha, S Hittalmani (2003) Performance of backcross involving trangressant doubled haploid lines in rice under contrasting moisture regimes. **Crop Sci.** 43:1448–1456.

Uga Y, K Sugimoto, S Ogawa, J Rane, M Ishitani, N Hara, Y Kitomi, Y Inukai, K Ono, N Kanno, H Inoue, H Takehisa, R Motoyama, Y Nagamura, J Wu, T Matsumoto, T Takai, K Okuno, M Yano (2013) Control of root system architecture by deeperrooting 1 increases rice yield under drought conditions. **Nat. Genet.** 45:1097–1102.

Venuprasad R, MT Sta Cruz, M Amante, R Magbanua, A Kumar, GN Atlin (2008) Response to two cycles of divergent selection for grain yield under drought stress in four rice breeding populations. **Field Crops Res.** 107:232–244.

Wu YP (2013) Drought tolerant rice lines by screening an IR64 mutant stock. (in Chinese with English abstract) **J. Taiwan Agric. Res.** 62:195–208.

Xu Y, JH Crouch (2008) Marker-assisted selection in plant breeding: from publications to practice. **Crop Sci.** 48:391–407.

Yoshida S, DA Forno, JH Cook, KA Gomez (1976) Laboratory manual for physiological studies of rice. p.61–65. IRRI, Los Banos, Philippines.

－編輯：楊純明